

На правах рукописи

Ганеева Лилия Ахатовна

**ОЦЕНКА УРОВНЯ АНТИОКИСЛИТЕЛЬНЫХ ФЕРМЕНТОВ  
И ЖЕЛЕЗА, МЕДИ, МАРГАНЦА В КЛЕТКАХ КАРТОФЕЛЯ,  
ИНФИЦИРОВАННЫХ *PHYTOPHTHORA INFESTANS*.**

03.00.07 – микробиология

Автореферат

Диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Казань - 2009

Работа выполнена в ТТГПУ, г. Казань и в Институте проблем экологии и недропользования академии наук РТ, г.Казань.

Научный руководитель: доктор биологических наук,  
профессор Морозов Николай Васильевич

Официальные оппоненты: доктор биологических наук,  
профессор Филимонова Мария Николаевна

доктор биологических наук,  
профессор Чиков Владимир Иванович

Ведущая организация: Татарский НИИ агрохимии и почвоведения Российской сельскохозяйственной академии, г. Казань.

Защита состоится 24 сентября 2009 г. В 13. 00 часов на заседании диссертационного Совета Д.212.081.08. при Казанском государственном университете по адресу: 420008, г. Казань, ул. Кремлевская, д.18

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке им. Н.И. Лобачевского Казанского государственного университета

Автореферат разослан «20» августа 2009 г.

Ученый секретарь  
диссертационного Совета  
доктор биологических наук, профессор

З.И. Абрамова

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**АКТУАЛЬНОСТЬ ТЕМЫ.** Фитофтороз, вызываемый оомицетом *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary – самое вредоносное заболевание картофеля в большинстве стран мира. Ежегодные общие потери этой культуры от заболевания и затраты на борьбу с ним стремительно растут и недавно оценивались примерно в 3 млрд. долларов (Захаренко В.А., 2003).

В начале XXI столетия была зафиксирована очередная волна резкого возрастания вредоносности фитофтороза. Серьезные изменения в биологии возбудителя заболевания в итоге привели к повышению его экологической пластичности, адаптивности и усилению патогенных свойств.

Взросший эпифитотиологический потенциал *P. Infestans* стал причиной снижения эффективности традиционных методов защиты картофеля, и агротехнические мероприятия в настоящее время имеют скорее профилактическое значение. Считается также, что возделывание устойчивых сортов картофеля не гарантирует получения стабильного урожая в условиях сильного развития болезни без применения фунгицидов.

Однако и химический метод может обеспечить приемлемый уровень контроля заболевания, но только при условии увеличения количества обработок. Так, в странах ЕС посадки картофеля опрыскивают 7–20 раз за сезон, что на 40% выше, чем в 70-х годах (Филиппов А.В., 2005). Дополнительные затраты на пестициды снижают рентабельность выращивания культуры, вызывают обеспокоенность потребителей картофеля, отдающих предпочтение экологически чистой продукции, и усиливают антропогенный прессинг на окружающую среду. Современная концепция интегрированной защиты картофеля ориентирована на использование, как химических, так и нехимических (организационно-хозяйственных, агротехнических и биологических) методов.

Альтернативой применению пестицидов являются биологические методы

защиты растений, в первую очередь те методы и приемы, которые индуцируют устойчивость растений к патогену.

Устойчивость растения к патогену определяется способностью распознать и своевременно включить механизм защиты. Наряду с индукцией синтеза фитоалексинов и гидролитических ферментов, к таким механизмам относится активация в инфицированных клетках и клетках, локализованных вблизи очага инфекции, программы собственной гибели - процесс, называемый гиперчувствительным ответом (ГО). Образуется зона мертвых обезвоженных клеток, которая служит барьером для дальнейшего распространения патогена. Установлено, что при ГО гибель клеток растений вызывается не прямым деструктивным действием патогена, а активацией им генетической программы гибели растительной клетки. Процесс сопровождается дыхательным взрывом - генерацией  $H_2O_2$  при участии NADPH-оксидазы цитоплазматической мембраны (Tada Y. et al., 2001).

При этом перекись водорода в малых концентрациях является индуктором апоптоза, а в высоких концентрациях вызывает некроз - быструю гибель клеток, без каких-либо морфологических изменений, характерных для апоптоза (ApeI K., Hirt H., 2004).

В настоящее время имеются убедительные свидетельства, что в реализации неспецифической устойчивости растений принимают участие активные формы кислорода и противостоящая им система антиоксидантной системы защиты. В частности, показано, что ингибирование системы антиоксидантной защиты (АОЗ) способно увеличить устойчивость картофеля к фитофторозу (Еланский С.Н., Попова И.И., 1998). Каталаза и пероксидаза являются ферментами, участвующими в деградации  $H_2O_2$ . При этом ключевую роль в реализации и направленности окислительно-восстановительных реакций, осуществляемыми этими ферментами, играют «переходные» металлы (металлы с переменной валентностью) (Ребров В.Г., Громова О.А., 1989; Сусликов В.Л., 2000).

Но, если влияние активности антиоксидантных ферментов, в частности каталазы, на формирование устойчивости и восприимчивости картофеля к фитофторе установлено (Панина Я.С. и др., 2004), то работы о характере влияния ионов железа, меди и марганца на эти процессы практически отсутствуют.

**ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ:** выявление уровня активности каталазы и пероксидазы и сопряженного с этим обмена железа, меди и марганца в картофеле, инфицированном двумя, отличающимися по агрессивности расами *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary и сопоставление этой активности с процессом формирования устойчивости или восприимчивости картофеля.

**Задачи исследования:**

1. Определить характер изменения активности каталазы и пероксидазы в клубнях картофеля при его инфицировании исходной (первичный полевой изолят) и агрессивной расами фитофторы.
2. Определить содержание железа, меди, марганца в клубнях картофеля, инфицированных исходной и агрессивной расами фитофторы.
3. Определить содержание железа, меди и марганца в зооспорангиях исходной и агрессивной рас фитофторы.
4. Оценить содержание железа, меди и марганца в почвах промышленного выращивания картофеля.
5. Исследовать характер влияния марганца на активность каталазы и пероксидазы в клетках картофеля, инфицированных фитофторой.
6. Определить возможность индуцирования устойчивости картофеля к фитофторозу обработкой растений в период вегетации соединениями марганца.

**НАУЧНАЯ НОВИЗНА РАБОТЫ.**

Впервые показан характер изменения активности каталазы и пероксидазы - основных ферментов, регулирующих содержание внутриклеточной перекиси водорода при инфицировании клеток картофеля расами фитофторы, отличающимися агрессивностью. Выявлена корреляция между агрессивностью

патогена, изменением активности двух антиоксидантных ферментов, содержанием железа, меди и марганца.

Показано в системах *in vivo* и *in vitro*, что восстановление баланса «Fe / Mn» индуцирует устойчивость картофеля к инфицированию фитофторой.

### **ПРАКТИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ РЕЗУЛЬТАТОВ.**

В проведенных полевых опытах было установлено, что опрыскивание растений в период вегетации растворами, содержащими марганец (особенно в форме сукцината марганца), индуцирует устойчивость клубней картофеля к инфицированию фитофторой.

### **ОСНОВНЫЕ ПОЛОЖЕНИЯ, ВЫНОСИМЫЕ НА ЗАЩИТУ**

1. Инфицирование клеток клубней картофеля двумя расами фитофторы индуцирует повышение активности каталазы и пероксидазы, и тем в большей степени, чем выше агрессивность патогена.

2. Содержание железа в инфицированных двумя расами фитофторы, клетках клубней картофеля выше, чем в интактных клетках, и возрастание содержания этого микроэлемента зависит от агрессивности расы патогена и коррелирует с нарастанием активности антиоксидантных ферментов.

3. Высокое содержание железа в зооспорангиях, возможно, является одним из механизмов подавления защитной системы растительных клеток фитофторой.

4. Восполнение дефицита марганца в почве путем опрыскивания растений в период вегетации растворами, содержащими марганец, повышает устойчивость картофеля к фитофторе.

### **АПРОБАЦИЯ РАБОТЫ.**

Материалы диссертации докладывались и обсуждались на: «Научно-практической конференции, посвященной 70-летию кафедры химии ТГГПУ», 2007 год; «Экологической конференции Поволжья», 2008 год.

**ПУБЛИКАЦИИ.**

По теме диссертации опубликовано 7 печатных работ, в том числе 3 в рекомендованных ВАК для публикации основных научных результатов диссертации на соискание ученой степени кандидата наук.

**ОБЪЕМ И СТРУКТУРА ДИССЕРТАЦИИ.**

Диссертация общим объемом в 118 страниц состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, результатов исследования, обсуждения, заключения, выводов, приложения; иллюстрирована 15 таблицами и 14 рисунками. Список литературы включает 140 наименований, в том числе 73 зарубежные публикации.

## СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

### Материалы и методы исследования

Объектом исследований служили изолят *Phytophthora infestans*, клубни картофеля сорта «Невский», а также образцы почвы. Все эти объекты были собраны и получены в хозяйствах Нижнекамского района Республики Татарстан.

Выделение возбудителя из пораженной ботвы проводили на ломтиках свеженарезанных клубней того же сорта картофеля (Шемякина В.П. и др., 1997).

Изолят *P. Infestans*, условно обозначенный «исходной» расой патогена, был выращен на агаризованной овсяной среде (Поединок Н.Л., Дьяков Ю.Т., 1981).

Для наращивания агрессивности патогена использовали газон из листьев картофеля применяя метод, разработанный во ВНИИ фитопатологии (Filiprov, A. V., Kuznetzova, M. A. et al., 2000). В общей сложности было проведено 5 пассажей патогена.

В экспериментах использовали клубни того же сорта картофеля, из которого был выделен патоген, и листья которого использовались для наращивания агрессивности.

Определения ферментативной активности, индекса агрессивности патогена и содержания микроэлементов проводили в брусочках картофеля, размером 7х10х30 мм, инфицированных исходной и агрессивной расами фитофторы. Контролем служили аналогичные брусочки картофеля, смоченные в том же растворе, на котором готовили суспензию зооспор. Каждый вариант опыта был представлен 20 образцами.

Процедура инфицирования: брусочки картофеля одной гранью (10х30 мм) на 3-5 секунд погружали в суспензию зооспорангиев (концентрация  $10^8$  в мл), разлитую слоем в 2-3 мм в чашки Петри. Инкубацию брусочков проводили при



комнатной температуре (18-23° С) в перекрытых чашках Петри. Инфицированная грань брусочка была обращена вверх.

Через 6 суток измеряли длину зоны поражения и определяли интенсивность спороношения по пятибалльной шкале: 0 – спороношение отсутствует, 5 – спороношение по всей поверхности пораженной зоны, 1-4 – промежуточные значения.

Индекс агрессивности патогена вычисляли по формуле:

$$X = \Sigma (I_i \cdot D_i) / n,$$

где  $I_i$  – средняя величина поражения, мм;  $D_i$  – средняя интенсивность спороношения, балл;  $n$  - количество заражений (Лаврова О.И., и др., 2003).

Для определения активности антиоксидантных ферментов и содержания микроэлементов с граней брусочков, которые были инфицированы, срезали слой ткани высотой в 2-3 мм. В этих срезанных частях и проводились указанные выше определения. С контрольных брусочков также срезали слой, обращенный вверх.

Активность каталазы определяли по Баху А.Н. и Опарину А.М. (Тенишева Н.Х., 2003).

Активность пероксидазы определяли в кинетической реакции с ферроцианидом калия (Рогожкин В.В., 2006).

Пробы, для определения содержания железа, марганца и меди в клубнях картофеля готовили следующим образом: навески весом 5 г смачивались концентрированной азотной кислотой, помещались в фарфоровые тигли, которые устанавливали в холодную муфельную печь. Температуру муфельной печи постепенно (в течении 2 ч.) поднимали до 450° С и выдерживали при этой температуре до полного озоления образца (~8 ч.). Зола растворяли в 50 мл 1 N азотной кислоте, отфильтровывали через беззольный фильтр. Фильтрат доводили в мерной колбе до 50 мл.

Содержание железа, марганца и меди определяли методом атомно-абсорбционной спектрофотометрии на спектрофотометре ААС-3. Определение

проводили в окислительном воздушно-ацетиленовом пламени: железа - при длине волны 248.3 нм, марганца – 279.5 нм, меди - 324.8 нм, (Хавезов И., Цалев Д., 1983; Прайс В., 1976; Славин У.В., 1971).

Концентрации металлов пересчитывались в мкг/г сырой растительной ткани по формуле:

$$C = (A \cdot 50) / m,$$

Где С – концентрация металла в образце, мкг/г; А – показания прибора, мкг/мл; 50 – объем аликвоты, мл; m – навеска, г.

Содержание металлов в суспензии зооспорангиев определяли следующим образом: раствор суспензии зооспорангиев объемом 100 мл выпаривали на водяной бане, сухой остаток ресуспендировал в 5 мл концентрированной азотной кислоты и кипятили в течение 10 мин. Затем раствор доводили дистиллированной водой до 10 мл и анализировали. Результаты пересчитывали по формуле:

$$C = (A \cdot 10) / 100,$$

где С – концентрация металла в суспензии, мкг/мл; А – показания прибора, мкг/мл; 10 – объем аликвотной части, мл; 100 – объем пробы, мл.

Отбор почвы осуществлялся методом «конверта», с 5 точек на расстоянии 3 м друг от друга. Образцы высушивали до воздушно-сухого состояния, растирали в фарфоровой ступке, просеивали через сито d 1 мм, корни и примеси в виде камней при этом удалялись. С разных участков поля было отобрано 10 подобных «конвертов».

Подготовка проб: на аналитических весах отбиралась навеска почвы в 2 грамма, к которой добавляли 10 мл 5 N азотной кислоты. Суспензию выдерживали 3 ч в кипящей водяной бане. Раствор фильтровали и доводили дистиллированной водой до объема 50 мл и анализировали. Результаты рассчитывали по формуле:

$$C = (A \cdot 50) / m,$$

где  $C$  – концентрация металла в образце, мкг/г;  $A$  – показания прибора, мкг/мл; 50 – объем аликвоты, мл;  $m$  – навеска, г.

Влияние марганца на резистентность растительных клеток к фитофторе изучали с использованием трех соединений этого элемента: сульфата марганца, комплекса марганец-ЭДТА (ООО «Агрохимснаб», Россия), сукцината марганца (Universal Nutrition, США). Во всех экспериментах использовали растворы указанных соединений с равной концентрацией по марганцу - 0.7 мкМ.

В опытах *in vitro* брусочки картофеля размером 7x10x30 мм перед инфицированием фитофторой выдерживали в растворах, содержащих марганец, 2 часа. Контролем служили брусочки, выдержанные в дистиллированной воде.

В полевом эксперименте кусты картофеля 3-хкратно опрыскивали указанными растворами: перед цветением, в фазу цветения и после цветения, с интервалом в 10 дней, из расчета 1 л раствора на растение.

Статистическую обработку данных проводили на компьютере с помощью прикладного пакета статистических программ «Statistica». Применялись следующие статистические методы и процедуры: корреляционный анализ (по Пирсону), метод множественной регрессии. Достоверность различий средних сравниваемых величин определялась по стандартному  $t$  критерию Стьюдента с поправкой Кейлса для малых выборок (Айвазян С.А. и др., 1989).

## **РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ**

В настоящей работе использовали две расы фитофторы. Первая, определяемая как исходная, представляла собой однократно культивированную на агаризованной овсяной среде культуру фитофторы. Вторая раса, условно обозначенная как агрессивная, представляла собой культуру фитофторы, полученную после пятикратного пассирования исходной расы патогена на газоне из живых листьев картофеля.

Определение индекса агрессивности, проведенное на картофельных кубиках, показало существенно большую степень поражения клеток при инокуляции их материалом, прошедшим 5 пассажей на газоне из листьев картофеля. Индекс агрессивности, согласно нашему определению, составлял для агрессивной расы 76, против 24 для исходной расы патогена (табл. 1).

Таблица 1

Показатели активности ферментов, содержания железа, меди, марганца и индексы агрессивности патогена в клубнях картофеля в разных экспериментальных группах (n=20 в каждой группе)

Экспериментальные группы	Индекс агрессивности патогена	Активность ферментов		Содержание металлов в клубнях, мг/кг сыр. в		
		Каталаза мкмоль/мин	Пероксидаза мкмоль/мин г. ткани	Fe	Cu	Mn
Контроль	0	9,81±0,49	31,76±0,48	11,68±0,52	2,09±0,17	6,15±0,42
Исходная раса	24	10,43±0,45	<b>40,52±1,95**</b>	<b>15,20±0,77**</b>	2,24±0,25	6,71±0,60
Агрессивная раса	76	<b>14,29±0,72**</b>	<b>58,38±1,43**</b>	<b>19,23±0,97***</b>	2,71±0,30	6,33±0,98

Примечание: различия статистически достоверны по сравнению с контролем \*p<0,05; \*\* p< 0,01; \*\*\* p <0,001

Известно, что перекись водорода, а также NO, этилен, салициловая и жасмоновая кислоты играют ключевую роль в возникновении реакции сверхчувствительности и развитию в здоровых тканях системной устойчивости растений (Dat et., al., 2000). В сложном и пока до конца неясном взаимодействии этих молекул ведущая роль, по-видимому, принадлежит перекиси водорода (О.Г. Полесская, 2007).

Каталаза и пероксидаза являются ферментами, которые принимают участие в регуляции содержания H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (О.Ю. Янковский, 2000; Е.Е. Дубинина, 2006). В связи с этим представлял интерес вопрос, какие изменения происходят в активности этих ферментов в клетках картофеля, инфицированных

фитофторой, и каков характер этих изменений в зависимости от агрессивности расы патогена.

Результаты определения активности каталазы свидетельствуют о том, что достоверное увеличение активности каталазы по сравнению с активностью в интактных клетках наблюдается только в клетках, инфицированных агрессивной расой фитофторы. В тоже время, достоверное увеличение активности пероксидазы по сравнению с ее активностью в контрольных клетках наблюдалось в клетках, инфицированных как исходной, так и агрессивной расами фитофторы: соответственно (табл.1).

Таким образом, наблюдается четкая зависимость между ростом агрессивности, проявляемой патогеном, и возрастанием активности каталазы и пероксидазы.

В отношении каталазы полученные нами данные согласуются с результатами исследований (Панина Я.С. и др. 2004), в которых установлено, что увеличение активности этого фермента приводит к повышенной восприимчивости картофеля к патогену и наоборот, ингибирование активности каталазы, в частности, салициловой кислотой и ее производными, индуцирует устойчивость растений к фитофторе.

Следует отметить, что полученные нами результаты свидетельствуют также о том, что при инфицировании фитофторой возрастает и активность пероксидазы, причем в большей степени, чем увеличивается активность каталазы.

Увеличение активности этих двух антиоксидантных ферментов не может не вызывать снижение внутриклеточной концентрации перекиси водорода, которая, как известно, отвечает за запуск защитных механизмов растительной клетки, в том числе ПКС. Поэтому не исключено, что таким образом при инфицировании фитофторозом происходит снижение содержания наиболее важного продукта окислительного взрыва ( $H_2O_2$ ), который отключает отдельное звено защиты растительной клетки.

Поскольку и каталаза, и пероксидаза являются железосодержащими ферментами, то представлял интерес вопрос о характере изменения содержания железа, а также меди и марганца. Определение содержания двух последних микроэлементов было обосновано тем, что на клеточном уровне имеет место сопряжение обмена их с железом (Ребров В.Г., Громова О.А., 2003).

Результаты определения содержания трех микроэлементов, представленные в указанной выше таблице 1, свидетельствуют о том, что из трех микроэлементов в клетках картофеля содержится более всего железа - в интактных клетках концентрация его составляла в среднем  $11,68 \pm 0,52$  мг/мл, тогда как меди –  $2,09 \pm 0,17$  мг/мл, а марганца –  $6,15 \pm 0,42$  мг/мл.

В инфицированных фитофторой клетках наблюдается увеличение содержания железа. Это увеличение тем значительнее, чем выше агрессивность расы патогена: если в интактных клетках концентрация его составляла в среднем  $11,68 \pm 0,52$  мг/мл, то в инфицированных исходной расой фитофторы -  $15,2 \pm 0,77$  мг/мл, а в инфицированных агрессивной расой -  $19,23 \pm 0,97$  мг/мл.

Следует отметить, что увеличение содержания железа в тканях клубней картофеля, инфицированных фитофторой, идет параллельно с нарастанием активности антиокислительных ферментов, то есть, наблюдается прямая корреляционная взаимосвязь. Для каталазы коэффициент корреляции составлял  $r=0.66$ ,  $p=0.032$ , для пероксидазы  $r=0.82$ ,  $p=0.015$ .

Ввиду того, что условия проведения эксперимента не обеспечивали поступление железа извне, то на следующем этапе исследований нами выяснялся источник поступления этого микроэлемента в инфицированные клетки. Предположительно, железо могло привноситься в них либо с инокулятом, либо поступать из незатронутых патогеном или наоборот, разрушенных фитофторой клеток.

Определение содержания трех микроэлементов в инокулятах показало, что в них также превалирует железо (табл. 2). Его количество более, чем в 13 раз превышало количество меди и более, чем в 40 раз количество марганца.

Таблица 2

## Концентрация железа, меди и марганца в зооспорангиях

Зооспорангии	Концентрация микроэлементов, мкг/мл		
	Fe	Cu	Mn
Исходная раса	20,58±7,33	1,47±0,70	0,48±0,22
Агрессивная раса	27,67±5,15	2,12±0,38	0,47±0,27

Известно, что способ прорастания зооспорангиев зависит от внешних условий, особенно от температуры: при повышенной температуре воздуха (20-27° С) зооспорангий не образует спор, а прорастает зародышевой трубкой, которая внедряется непосредственно в растительную ткань. Поскольку все манипуляции: наработка инфекционного материала, заражение и последующая инкубация картофельных кубиков проводились при комнатной температуре, то вероятнее всего высокое содержание этого элемента в инфицированных клетках связано с привнесением его прорастающей зародышевой трубкой зооспорангия.

Установлено, что при отсутствии достоверной разницы в количестве железа в инокулятах исходной и агрессивной рас, различия по содержанию железа в клетках, инфицированных агрессивной расой фитифторы, достоверно выше, чем в клетках, инфицированных исходной расой. Поэтому не исключается, что этот элемент мог привноситься в пораженные фитифторой клетки и из разрушенных патогеном клеток.

В целом, отмечается четкая взаимосвязь: увеличение агрессивности патогена сопровождается увеличением активности антиокислительных ферментов и увеличением содержанием железа в пораженных фитифторой клетках.

Исходя из того, что зооспорангии содержат очень большое количество ионов железа, можно предположить, что привнесение его в клетку

прорастающей зародышевой трубкой каким-то образом способствует индуцированию экспрессии генов каталазы и пероксидазы. А высокая активность последних сводит на нет защитный механизм «окислительного взрыва», что обеспечивает фитофторе благоприятные для собственного развития условия. В таком случае, применительно к этому патогену, выражение «все свое ношу с собой» следует, вероятно, считать «своими» ионы железа.

Известно, что соотношение микроэлементов в клетках является интегральным показателем, обобщающим закономерности их накопления и распределения, как на организменном, так и на клеточном уровнях, и что соотношение «Fe / Mn» в растительных клетках является величиной достаточно постоянной (Альберт А., 1989).

Таблица 3

Соотношение «Fe / Mn» и «Fe / Cu» в интактных клетках, клетках, инфицированных двумя расами фитофторы, и в зооспорангиях исходной и агрессивной рас

	Контроль (интактные клетки)	Клетки, инфицирован- ные исходной расой	Клетки, инфицирован- ные агрессивной расой	Зооспорангии (исходная раса)	Зооспоран- гии (агрессивная раса)
Fe/Mn	1,89	2,26	3,01	42,87	58,87
Fe/Cu	5,59	6,78	7,09	14,0	13,03

Полученные нами данные (табл. 3) свидетельствуют, что соотношение «Fe / Mn» увеличивается при поражении картофеля фитофторой, причем тем больше, чем выше агрессивность патогена, изменяясь с 1,89 в контроле до 2,26 в первом опытном варианте (исходная раса) и до 3,01 во втором опытном варианте (агрессивная раса). Особо обращает на себя внимание значительное преобладание железа по сравнению с марганцем в зооспорангиях – его больше в 42,8 раза в зооспорангиях исходной расы и в 58,4 раза в зооспорангиях агрессивной расы.



Такой характер изменения в соотношении «Fe / Mn» не представляется случайным. Оно свидетельствует, на наш взгляд, о том, что не только железо, привносимое зооспорангиями в момент инокуляции, является одним из механизмов способствующих подавлению защитной системы растения, но и резкое относительное снижение концентрации марганца в пораженных фитофторой клетках.

Что касается соотношения «Fe / Cu», то характер изменения его в клетках картофеля совпадал с характером изменения соотношения «Fe / Mn». Соотношение «Fe / Cu» в зооспорангиях было также выше, чем в растительных клетках, но различие было не столь значительно, как в случае с соотношением «Fe / Mn».

С целью выяснить степень влияния марганца для развития фитофторы были проведены эксперименты, в которых недостаток этого элемента восполняли искусственно, инкубируя картофельные брусочки в среде, содержащей ионы марганца.

При выборе соединений марганца мы руководствовались результатами исследований (Ткаченко В.М., 1986; Осипов А.Н., 1993), которые использовали для внесения нужных микроэлементов этилендиаминтетрауксусную (ЭДТА), оксиэтилендифосфорную (ОЭДФК), диэтилентриамин-пентауксусную (ДТПУ) кислоты, а также ряд других лигандов. Авторы пришли к выводу о недостаточной эффективности таких соединений из-за влияния почвенных микроорганизмов на органическую часть соединений и малой диффундирующей способностью этих соединений. Ими было рекомендовано проводить обработку растений микроудобрениями, где в качестве хелатообразующих агентов используются янтарная и лимонная кислоты (Ткаченко В.М., 1986).

В экспериментах *in vitro* нами использовались три соединения: хелатный комплекс Mn-ЭДТА, сукцинат марганца, и, для сравнения, традиционное микроудобрение - сульфат марганца.

Результаты экспериментов (табл. 4) свидетельствовали, что все соединения марганца приводят к снижению активности и каталазы, и пероксидазы. Значительное снижение ферментативной активности наблюдалось в клетках, обработанных сукцинатом марганца. При этом клетки картофеля проявляли наибольшую устойчивость к патогену.

Таким образом, восполнение дефицита марганца, так или иначе приводящее к восстановлению баланса «Fe / Mn», повышало устойчивость растительных клеток к фитофторе.

Интересным оказался и тот факт, что в обработанных соединениями марганца клетках картофеля содержание железа было на 10,6–18,5 % ниже, чем в контрольных, не обработанных соединениями марганца клетках. Это дает основание полагать, что, возможно, в присутствии ионов марганца клетка активно препятствует проникновению ионов железа.

Поскольку поражение картофеля фитофторой на полях Нижнекамского района явление достаточно устойчивое, то естественно было предположить, что в какой-то мере это может быть связано с особенностями баланса железа и марганца, а также меди в почвах, на которых выращивается картофель.

Определение содержания этих микроэлементов показало, что почвы оптимальны по содержанию железа (1002,1 +17,1 мг/кг почвы) и меди (20,3+4,8 мг/кг почвы), но дефицитны по содержанию марганца. Причем, содержание последнего более чем в три раза уступает оптимальному для этого микроэлемента количеству. По данным некоторых исследователей (Трахтенберг И.М., 1994) его должно быть около 500 мг на кг сухой почвы. В почвах же, на которых выращивали картофель, марганца содержалось в среднем 165,5+11,4 мг/кг сухой почвы.

Результаты исследований Гундаревой А.Н. (2004) свидетельствуют о том, что кислая реакция почвы ( $\text{pH} < 6,0$ ) благоприятствует усвоению растениями  $\text{Mn}^{2+}$ , а слабощелочная реакция ( $\text{pH} > 7,5$ ) стимулирует образование гидрата

Mn(OH)<sub>2</sub>, трудно усваиваемого растениями. По данным исследований, выполненных районной агрохимической лабораторией, почвы Нижнекамского района имеют нейтральную или слабо-щелочную реакцию (рН 7.0-7.5).

Из этого следует, что почвы, на которых произрастает картофель, не только дефицитны по марганцу, но и имеют кислотность, которая затрудняет его усвоение.

В полевом эксперименте дефицит марганца восполняли опрыскиванием растений в период вегетации растворами сульфата марганца, марганца с янтарной кислотой и марганца-ЭДТА. Опрыскивание проводили трижды: перед цветением, в фазу цветения и после цветения, с интервалом в 10 дней, из расчета 1 л раствора на растение. Концентрация по марганцу была 0,07 мкМ.

Всего было сформировано 4 группы растений: первая группа являлась контрольной (соединения марганца не применялись), вторая группа растений опрыскивалась раствором сульфата марганца, третья группа – раствором марганец-ЭДТА, четвертая – раствором сукцината марганца. Все остальные проводимые агротехнические мероприятия в группах были одинаковы.

Из собранных осенью клубней нарезали брусочки, которые после заражения агрессивным штаммом фитофторы и последующей 6-ти дневной инкубации исследовались на устойчивость к развитию инфекционного процесса. Проводилось также определение активности каталазы и пероксидазы и содержание в клетках железа, марганца и меди.

Результаты исследований представлены в таблице 4. Видно, что максимальную агрессивность фитофтора проявляет в контрольной группе (индекс агрессивности равен 78).

Таблица 4

Показатели активности ферментов, содержания железа, меди, марганца и индексы агрессивности патогена в клубнях опытных растений, обработанных в период вегетации соединениями марганца

Экспериментальные группы	Проявление агрессивности патогена	Активность ферментов		Содержание металлов в клубнях, мг/кг сыр. ткани		
		Каталаза мкмоль/мин грамм	Пероксидаза мкмоль/мин грамм	Fe	Cu	Mn
Контроль (вода)	78	15,53±0,60	56,86±4,36	23,30±2,14	2,10±0,59	6,80±0,48
Сульфат марганца	60	12,51±0,23	54,63±5,11	20,24±0,66	2,01±0,27	7,85±0,67
Mn-ЭДТА	37	<b>8,07±0,28*</b>	44,06±5,33	16,30±1,55	2,51±0,35	10,56±0,52
Сукцинат марганца	32	<b>7,51±0,30**</b>	42,50±5,80	<b>13,01±1,10**</b>	3,09±0,40	12,10±0,38

Примечание: различия статистически достоверны по сравнению с контролем \* $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$

В группе, обработанной раствором сульфата марганца, средний показатель индекса агрессивности был равен 60. Показатели индекса агрессивности в группах, которые обрабатывались комплексом Mn-ЭДТА и сукцинатом марганца, равнялись, соответственно, 37 и 32. То есть, агрессивность патогена достаточно резко снижалась в клубнях тех растений, которые обрабатывались соединениями марганца с ЭДТА и янтарной кислотой. В двух последних опытных вариантах проявление агрессивности фитогены было более, чем в 2 раза ниже по сравнению с контрольным вариантом.

Активность каталазы в клубнях снижалась, параллельно снижению индекса агрессивности, достигая минимальных значений в клубнях картофеля, обработанного комплексами марганца с ЭДТА и янтарной кислотой – 7,51±0,30 мкмоль/мин грамм и 8,07±0,28 мкмоль/мин грамм, соответственно. В контроле эта величина составляла 15,53±0,60 мкмоль/мин грамм (различия статистически достоверны,  $p < 0.01$ ).

Взаимосвязь между индексом агрессивности и содержанием марганца в ткани клубней выражается регрессионным уравнением (рис.1):

$$R=0.95, p=0.022, F=19,8$$

$$\text{Индекс агрессив.} = 112.0 - 7.335 \cdot \text{Mn}$$

Между индексом агрессивности и активностью каталазы:

$$R=0.98, p=0.011, F=77,5$$

$$\text{Индекс агрессив.} = 8.205 \cdot \text{Каталаза} - 36.5$$

Множественная регрессия всех этих показателей моделируется следующим уравнением:

$$R=0.99, p=0.048, F=171,4$$

$$\text{Индекс агрессив.} = 13.00 + 5.66 \cdot \text{Каталаза} - 2.622 \cdot \text{Mn}$$

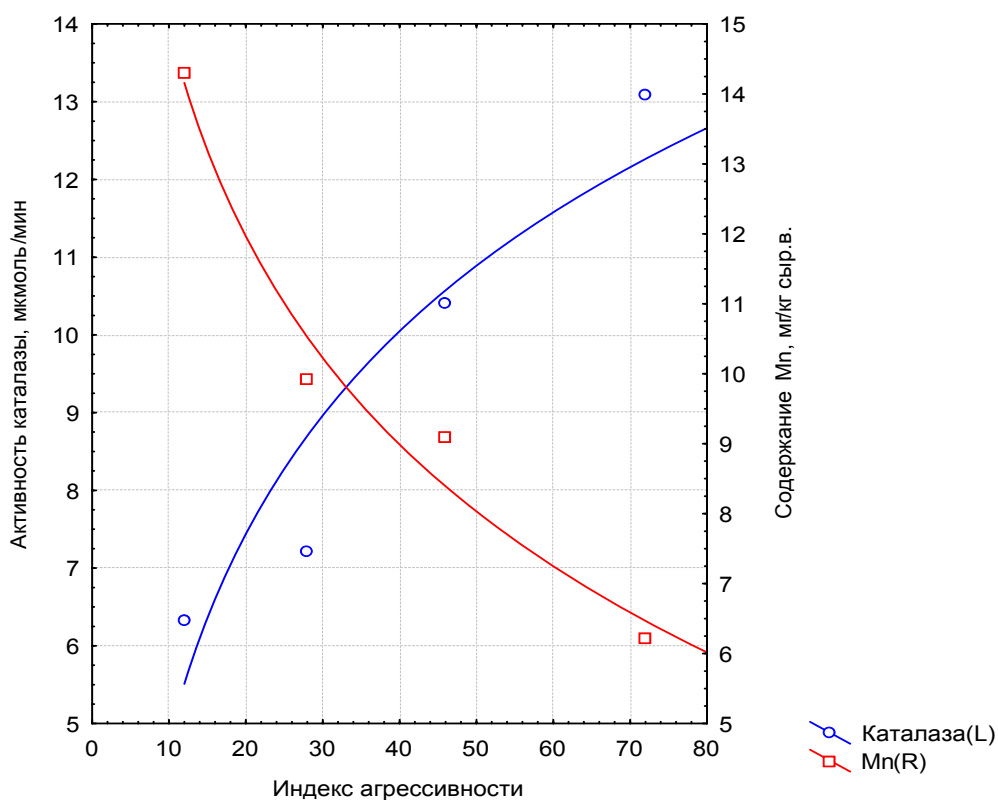


Рис. 1 Зависимость индекса агрессивности от активности каталазы и содержания Mn в клубнях картофеля опытных растений, обработанных в период вегетации соединениями марганца

Снижение активности пероксидазы было менее значительным: от  $56,86 \pm 4,10$  мкмоль/мин в контроле до  $42,50 \pm 5,80$  мкмоль/мин в клетках, обработанных сукцинатом марганца.

Что касается содержания марганца, то вполне естественно, что его было больше в клетках, обработанных соединениями марганца, чем в контрольных. Причем наиболее высокое содержание наблюдалось в клетках, обработанных сукцинатом марганца –  $12,10 \pm 0,38$  мг на кг сырой ткани, против  $6,80 \pm 0,75$  мг/кг в контроле. В клетках, обработанных комплексом марганец-ЭДТА и сульфатом марганца, его содержалось  $10,56 \pm 0,52$  мг/кг и  $7,85 \pm 0,67$  мг/кг сырой ткани, соответственно.

Содержание меди менялось в том же порядке, в каком происходило увеличение содержания марганца. Исключение представлял только вариант с сульфатом марганца ( $2,01 \pm 0,27$  мг/кг сырой ткани), его содержание было на уровне контроля ( $2,10 \pm 0,59$  мг/кг сырой ткани). На 20% количество меди увеличилось в варианте с марганец-ЭДТА и почти на 50% в варианте с сукцинатом марганца:  $2,51 \pm 0,35$  мг/кг сырой ткани и  $3,09 \pm 0,40$  мг/кг сырой ткани, соответственно.

Своеобразным был характер изменения содержания железа. Максимальное количество его –  $23,30 \pm 2,14$  мг/кг сырой ткани было в контрольных клетках. По мере снижения его содержания варианты опыта располагаются в следующем порядке: вариант с сульфатом марганца ( $20,24 \pm 0,66$  мг/кг), вариант с комплексом марганец-ЭДТА ( $16,30 \pm 1,55$  мг/кг) и вариант с сукцинатом марганца ( $13,01 \pm 1,10$  мг/кг).

Соотношение «Fe / Mn» изменялось следующим образом: в контроле оно было равно 3,43; при внесении сульфата марганца – снизилось до 2,57; при обработке растений комплексом Mn-ЭДТА – до 1,55; а при применении сукцината марганца – равно 1,07 (Рис. 2). Так же как и в эксперименте *in vitro*, уменьшение соотношения «Fe / Mn» идет параллельно снижению активности

антиокислительных ферментов при опрыскивании растений соединениями марганца.

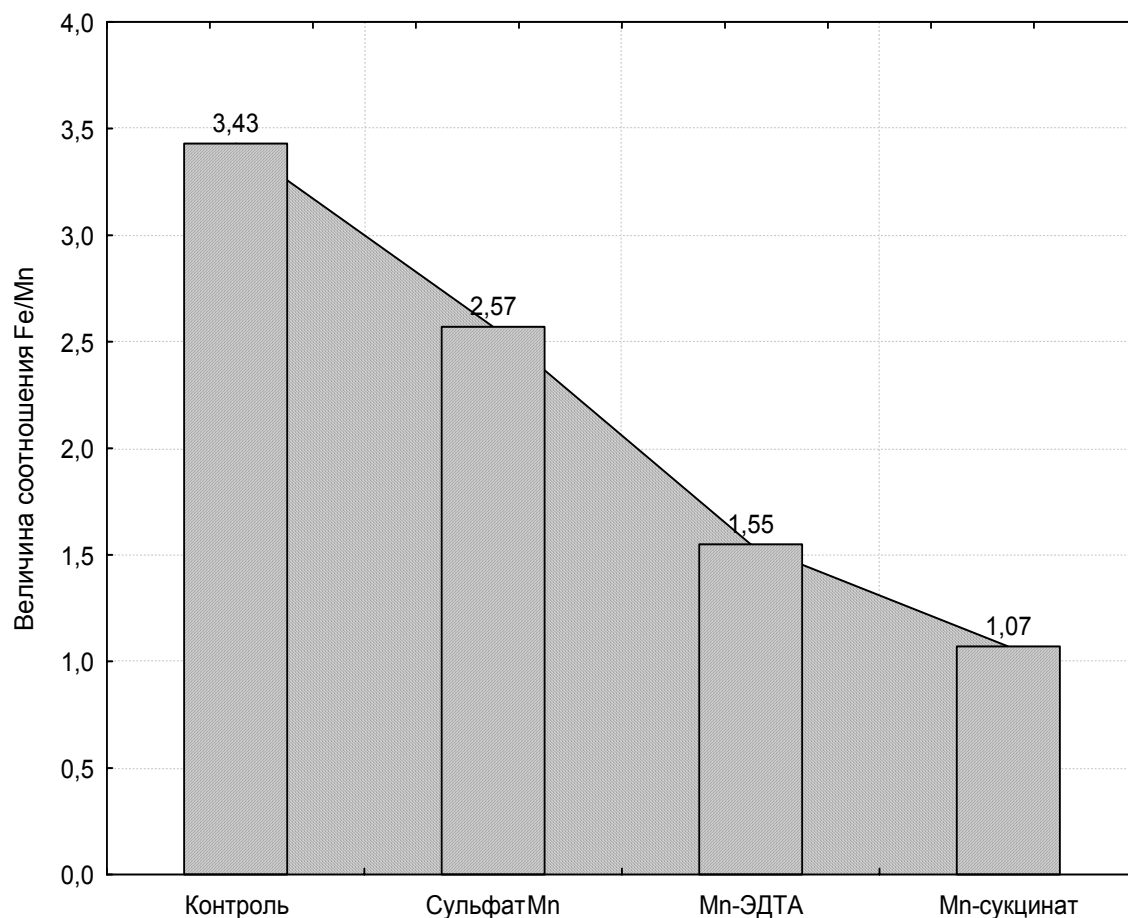


Рис.2 Изменение соотношения «Fe / Mn» в клубнях картофеля, опытных растений, обработанных в период роста соединениями марганца

Следует отметить, что характер изменения содержания железа в клетках клубней картофеля после опрыскивания растений в период вегетации растворами, содержащими ионы марганца, совпадает с характером изменения содержания железа, полученного в опытах *in vitro* (инкубация картофельных кубиков в чашках Петри в растворах, содержащими соединения марганца). Но снижение содержания железа в клетках после обработки растений соединениями марганца было более значительным. Это свидетельствует в пользу ранее высказанного предположения, что ионы марганца препятствуют проникновению ионов железа в клетку. Вероятнее всего, что этот процесс не

является следствием пассивной диффузии указанных ионов через клеточную мембрану, а идет под активным контролем самой растительной клетки.

В целом, результаты исследований свидетельствуют, что увеличение содержания в растительных клетках марганца сопровождается снижением активностей двух антиоксидантных ферментов, снижением содержания железа и, наконец, возрастанием устойчивости картофеля к фитофторозной инфекции.

## **ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

В результате выполненных исследований и экспериментов было установлено, что в инфицированных фитофторой клетках возрастает активность каталазы и пероксидазы и это возрастание тем выше, чем выше агрессивность патогена. Высокое содержание железа в зооспорангиях является, вероятно, одним из способов создания фитофторой благоприятных условий своего развития. Опыты *in vitro* - инкубация кубиков картофеля в растворах, содержащих марганец, в той или иной мере приводящая к восстановлению баланса железо/марганец, в определенной степени повышает устойчивость клеток картофеля к инфицированию фитофторой. Данное заключение подтверждается результатами полевых опытов: растения, которые опрыскивались соединениями марганца, были более устойчивы к фитофторозу. Причем, наибольшую устойчивость к фитофторе проявляли клубни растений, которые опрыскивались раствором сукцината марганца.

Определение содержания трех микроэлементов в почве полей, на которых возделывался картофель в Нижнекамском районе показало, что эти почвы оптимальны по содержанию железа и меди, но дефицитны по марганцу.

Разумеется, что решить проблему фитофтороза исключительно обработкой соединениями марганца не представляется возможным. Однако, в определенной степени повысить устойчивость к инфицированию и развитию фитофтороза представляется вполне реальным.



## ВЫВОДЫ

1. В инфицированных фитофторой тканях картофеля наблюдается повышение активности каталазы и пероксидазы. Рост активности более выражен при инфицировании тканей агрессивной расой.
2. В инфицированных патогеном (особенно агрессивной расой) тканях картофеля повышается содержание железа.
3. При поражении картофеля фитофторой возрастает соотношение «Fe / Mn» и «Fe / Cu». В зооспорангиях соотношение «Fe / Mn» выше на порядок, чем в растительных клетках.
4. Почвы в исследуемой зоне выращивания картофеля оптимальны по содержанию железа и меди, но дефицитны по марганцу (1/3 от оптимума).
5. Обработка растений в период вегетации растворами, содержащими соединения марганца, повышает устойчивость картофеля к фитофторе.

## СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Ганеева, Л.А. Активность антиокислительных ферментов в клубнях картофеля при повышении агрессивности фитофторы / Л.А. Ганеева, Н.В. Морозов, В.С. Валиев // Плодородие. – 2007. -№4. -С. 18-19.
2. Ганеева, Л.А. Особенность подготовки образцов картофеля при изучении их устойчивости к фитофторе / Л.А. Ганеева // Ученые записки Казанской Государственной академии ветеринарной медицины. –2009. -Т. 196. –С. 81-85.
3. Ганеева, Л.А. Влияние соединений марганца на активность каталазы и пероксидазы и на проявление агрессивности фитофторы / Л.А. Ганеева, И.С. Докучаева // Вестник КГТУ. -2009. -№6. -С. 20-23.
4. Ганеева Л.А. Изменение активности каталазы и содержания железа в клубнях картофеля при внесении удобрений / Л.А. Ганеева, Н.В. Морозов,

В.С. Валиев // Материалы Научно-практической конференции по изучению экологии и географии Среднего Поволжья. Казань, 2008. – С. 110-111.

5. Ганеева Л.А. Содержание меди, железа, марганца и стронция в тканях коронарных сосудов при поражении хламидийной и цитомегаловирусной инфекциями / Л.А. Ганеева, В.С. Валиев // Научно-практическая конференция молодых ученых. Тезисы докладов ГИДУВа, Казань, 2004. -С. 50.

6. Ганеева Л.А. Изменение активности каталазы, пероксидазы и содержания железа, меди и марганца в клетках *Elodea Canadensis* / Л.А. Ганеева, Е.Ю. Ситникова // Вторая международная научно-практическая конференция «Экология биосистем: проблемы изучения индикации и прогнозирования». Тезисы докладов, Астрахань, 2009. –С. 205-206.

7. Ganeeva, L.A. The content of iron and copper ions in water, soil and *Elodea canadensis* cells of small lakes / L.A. Ganeeva, E.U. Sitnikova // Abstr. 13<sup>th</sup> annual Symposium for Biology Students of Europe, Kazan, 2009. - P. 75-76.

Выражаю искреннюю благодарность к.б.н., с.н.с. РПЦПБ СПИД (г. Казань) Уразову Наилу Гумеровичу за ценные советы и консультации; Миннуллину Муниру Бизяновичу, начальнику управления сельского хозяйства и продовольствия Нижнекамского района Республики Татарстан, за предоставление возможности проведения полевых экспериментов. Благодарю сотрудника Института проблем экологии и недропользования Академии наук Республики Татарстан Валиева Всеволода Сергеевича за помощь в выполнении экспериментов.

Просьба отзывы отправлять по факсу:

Отдел аспирантуры Казанского государственного университета:

(843) 238-76-01

или на e-mail: kolbatonalilya@mail.ru